



TRABALHO DE GRADUAÇÃO

ENGENHARIAS 2020

FABRICAÇÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA A BASE DE MEL ALTERANDO VARIÁVEL DE PROCESSO

Anna Laura Pinheiro Biasini¹

Tiago Pagan¹

Monica Tais Siqueira D'Amelio Felipe²

Universidade São Francisco

tipagan46@gmail.com

¹Aluno do Curso de Engenharia Química, Universidade São Francisco; Campus Bragança Paulista

²Professora Orientadora Doutora, Curso de Engenharia Química, Universidade São Francisco; Campus Bragança Paulista.

Resumo. O hidromel é uma bebida popularmente conhecida em algumas regiões da Europa, onde sua composição provém da diluição do mel em água com adição de nutrientes e leveduras. No Brasil seu consumo ainda é considerado baixo diante de outros tipos de bebidas fermentadas, mas com crescente consumo. Por ser um clima diferente da Europa, as condições de fabricação são diferentes, por isso o objetivo deste trabalho foi o estudo e a fabricação de hidromel com base na fermentação dos açúcares do mel, encontrando o rendimento da reação após a fermentação em três diferentes temperaturas, a partir da determinação do teor alcoólico da reação de fermentação. Utilizou-se o fermento Lalvin EC1118 devido às suas características fermentativas em diferentes temperaturas. Os ensaios foram conduzidos em balões volumétricos de 1L, acompanhados quanto à redução da concentração de açúcares e produção de álcool durante a fermentação. As conversões obtidas foram relacionadas às condições de temperatura e comparadas com o rendimento teórico. As características físico-químicas foram comparadas com a literatura e verificou-se que apenas a fermentação realizada à temperatura ambiente apresentou conversão indicada pela literatura e legislação vigente de 10,4%.

Palavras-chave: Hidromel, fermento, reação, mel, biorreator.

Abstract. Mead is a drink popularly known in some regions of Europe, where its composition comes from the dilution of honey in water with the addition of nutrients and yeasts. In Brazil, its consumption is still considered low compared to other types of fermented drinks, but with increasing consumption. Because it is a different climate from Europe, the manufacturing conditions are different, so the objective of this work was the study and manufacture of mead based on the fermentation of honey sugars, finding the reaction yield after fermentation at three different temperatures, from the determination of the alcoholic content of the fermentation reaction. Lalvin EC1118 yeast was used due to its fermentative characteristics at different temperatures. The tests were carried out in 1L volumetric flasks, followed by the reduction of sugar concentration and alcohol production during fermentation.

The obtained conversions were related to the temperature conditions and compared with the theoretical yield. The physical-chemical characteristics were compared with the literature and it was found that only the fermentation carried out at room temperature showed a conversion indicated by the literature and current legislation of 10.4%.

Keywords Mead, fermentation, reaction, honey, bioreactor

Introdução

Bebidas fermentadas a base de mel vem se tornando popularmente conhecida no Brasil, sendo assim, o hidromel vem sendo difundido em território nacional, pois além de suas propriedades nutricionais e terapêuticas, há valor agregado no produto final o que proporciona movimento econômico ao setor. No entanto, mesmo com sua importância social, ambiental e econômica, há poucos estudos científicos que abordam as propriedades físico-químicas, reacionais, palinologias que podem padronizar o processo de fabricação, qualidade e rendimento (DANTAS, 2016).

Segundo a Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 2008, Anexo III, Regulamento Técnico para a Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Hidromel, Art. 48, o Hidromel é a bebida com graduação alcoólica de 4 a 14%, em volume a 20°C, obtida pela fermentação alcoólica de solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável (BRASIL, 2008).

Neste contexto, existe uma necessidade de aprimorar parâmetros de processo a fim de garantir maximização em sua eficiência e tempo de fabricação, pois, durante o processo de extração de mel há perdas significativas do produto, uma vez que, em seu manuseio, parte do material ficará retida em utensílios, equipamentos e colmeias (FERNANDES et al., 2009).

Como o processo de fabricação é pouco estudado, usualmente adota-se uma metodologia próxima ao processo de fabricação de vinhos, o qual consiste industrialmente a um processo fermentativo em batelada, em que há ativação e isolamento de microrganismos, o que permite que a fermentação aconteça sob excelentes condições (QUEIROZ, 2014).

O processo de batelada nos processos fermentativos é útil por permitir um longo tempo de processo em reações lentas e a conservação de substratos mesmo em baixo nível e volume. Para o uso do modelo de biorreator é necessário conhecer as variáveis que interferem no processo como velocidade, crescimento e morte das células do inóculo (meio de cultivo de concentração adequada, a ser usada na fermentação do mosto) (GONZALES, 2004).

As características principais que define um hidromel de qualidade, estão diretamente ligadas à sua composição e o teor de compostos voláteis, tais como: alcoóis, ésteres, aldeídos, ácidos carboxílicos, entre outros. O volume gerado destes compostos está relacionado com a qualidade da matéria prima, condições de fermentação e também a maturação (MENDES-FERREIRA et al., 2010).

Algumas precauções no preparo do mosto implicam a garantia de uma boa fermentação, impossibilitando a proliferação de bactérias que possuem capacidade de metabolizar os açúcares gerando ácidos carboxílicos, o que acarreta aumento nos níveis de acidez volátil da bebida e origina ésteres anormais e indesejáveis (PEREIRA et al., 2009).

Neste contexto, foi estudada a influência da variação de temperatura no processo fermentativo de produção do hidromel. Com finalidade determinar qual o melhor ambiente para a fermentação ocorrer, garantindo assim que os processos ocorram de maneira a garantir que a fermentação atinja seu ponto ideal no menor de tempo possível. Sendo assim, propor um ambiente que traga aos processos de fabricação de hidromel confiabilidade e garantia de fermentação. Ademais, foi analisado o processo de fermentação dos açúcares do mel em escala de laboratorial, pela construção de três biorreatores anaeróbicos para condicionamento

das amostras com o objetivo de aprimorar métodos e variáveis de processo. Este procedimento visa a maximização da velocidade em relação às condições de temperatura ambiente. Para atingir esse objetivo serão fabricadas 3 amostras de água em mel com a mesma concentração, separando-as em três condições: temperatura controlada em aproximadamente 10°C, a segunda amostra submetida a 35°C por meio de uma lâmpada incandescente de 100 W e a terceira amostra em temperatura ambiente, com a influência das variações climáticas.

Hidromel

O hidromel é um produto amplamente conhecido e consumido no Continente Europeu. Porém, no Brasil, a popularidade de produtos com essas características ainda é baixa (MATTIETTO et al., 2006). Seu consumo é reconhecido como um dos mais antigos da humanidade, provavelmente antes até mesmo do vinho e prenuncia a cerveja (PEREIRA, 2008).

Segundo o Decreto nº 6871 de 4 de junho de 2009, normas que regem a fabricação de bebidas alcoólicas, “(...) é a bebida com graduação alcoólica de 4 a 14 por cento em volume, 20°C, obtida pela fermentação alcoólica de solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável” (BRASIL, 2009). A instrução Normativa de 2012 estipula parâmetros legais para fabricação de hidromel, onde destaca a proibição o uso de açúcar (sacarose) para a produção dessa bebida (BRASIL, 2012). De acordo com este instrumento legal, o hidromel pode ser classificado em seco ou suave, de acordo a quantidade de açúcar na bebida (BRASIL, 2012).

Portanto, trata-se de uma bebida fermentada composta de mel, água e leveduras. Seu teor alcoólico pode variar de 8 a 18% em volume de álcool e sua fermentação pode variar de alguns meses a anos e isso está diretamente relacionado principalmente ao tipo de mel, da levedura, da nutrição e do controle de pH (NAVRATIL et al., 2001, SROKA e TUSZYNSKI, 2007, KAHOUN et al., 2008, MENDES-FERREIRA et al., 2010). A água na produção de bebidas fermentadas deve ser livre de impurezas, filtrada, sem cloro, sabor e cheiro, inócua, livre de contaminações, para servir de nutriente para as leveduras fermentativas (REBELLO, 2009).

Os tipos de hidromel que podem ser fabricados são seco e suave. Essa característica é adquirida pela forma e tecnologia implementada ao processo. Esta produção depende do tempo de fermentação, e principalmente da concentração de mel na solução com água e da graduação alcoólica resultante. No passado, na produção do hidromel, a fermentação alcoólica era resultado do crescimento de micro-organismos selvagens presentes no mel de forma natural. Nestes casos, não é possível prever a fermentação, há casos que tornam o hidromel não consumível pela presença de leveduras contaminantes e de bactérias que alteram diretamente o sabor e suas características. Nos processos atuais de hidromel, para a redução de riscos de contaminação, leveduras comerciais têm sido utilizadas para se estabelecer maior controle durante o processo fermentativo (MENDES-FERREIRA et al., 2010, Roldan et al., 2011).

Processo Fermentativo do hidromel

A fermentação do hidromel pode ser realizada de vários métodos que utilizam bioreatores, que podem ser operados de forma descontínua, descontínua alimentada ou contínua. (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001; PACHECO, 2010) dentre as quais destaca-se abaixo o modo descontínuo e descontínuo alimentado.

Um dos processos fermentativos ocorre em biorreatores no sistema de batelada, ou seja, não há adição ou retirada de material durante o processo da reação. Ele é um dos sistemas mais utilizados pela facilidade de operação, porém se desenvolve em reatores de

volume pequeno e, por isso, tem-se baixo rendimento e, conseqüentemente, baixa produtividade (CARVALHO e SATO, 2001). O processo de operação inicia quando a amostra a ser fermentada é adicionada no biorreator no sistema de batelada e inoculada com o microrganismo. O fermentador é fechado o que bloqueia a entrada de O₂ e garante apenas a saída de CO₂ (MARTINEZ, 2007). A fermentação termina quando a máxima conversão dos açúcares em álcool é alcançada, instante no qual é retirada a amostra. O produto já fermentado é transferido para as etapas de recuperação e purificação do produto. Após a limpeza, etapa de esterilização do biorreator, novas bateladas podem ser inseridas para uma nova fermentação (SOUSA, 2016).

Há também o processo de batelada alimentada, neste método operacional, a adição dos inóculos e nutrientes é controlada e ficam no processo até o final da fermentação. Ele tem se mostrado eficiente e versátil nos processos fabricação de fermentados, pois apresentam um pequeno risco de contaminação, e permite a utilização dos fermentadores para a fabricação de diversos produtos (CARVALHO e SATO, 2001). É comum utilizar várias dornas de fermentação independentes, e podem ser operados com ou sem reciclo de células (SOUSA, 2016).

O processo acima descrito apresenta vantagens em relação aos outros tipos processos, como por exemplo, a produção de concentrações elevadas de células. Neste último, tempo de processamento é alto, devido aos produtos associados ao crescimento celular, além do melhor controle das condições de adição de substratos durante a fermentação (NEVES, 2003).

A fabricação do hidromel sua estrutura pode ser considerada “simples”, visto que se resume a diluição do mel em água e no desenvolvimento biológico que é formado por reações bioquímicas sequenciadas. No entanto, no decorrer do desenvolvimento há diversas variáveis que não podem ser controladas pelo fator humano e, conseqüentemente impacta no resultado final. O clima, o período do ano, que determina as flores disponíveis, e a existência de predadores são alguns destes aspectos (SILVA, et al. 2006). As características sensoriais do hidromel estão relacionadas à composição de compostos voláteis, tais como: álcoois, ésteres, aldeídos, ácidos carboxílicos, entre outros. A presença e concentração destes compostos estão relacionadas com a qualidade da matéria prima, condições de fermentação e também à maturação (MENDES-FERREIRA et al., 2010), as quais são variáveis do processo.

Variáveis do processo

As variáveis do processo são cruciais para uma boa fermentação e são elas a qualidade da matéria prima, temperatura, concentração de açúcar e disponibilidade de nutrientes são essenciais para a qualidade do hidromel.

Indesejáveis do Processo

Atrasos no processo fermentativo relacionados ao estresse osmótico, falta de nutrientes essenciais ou em função de temperatura inadequada, podem gerar compostos e ou sabores não desejáveis, dando origem a um hidromel de paladar desagradável, com sabor residual gerado pelas leveduras em função da incapacidade de adaptar-se ao meio (PEREIRA, 2009).

Pressão Osmótica

O estresse é a pressão osmótica que é a força que existe entre duas soluções de diferentes concentrações separadas por uma membrana semipermeável. Quando a levedura é exposta ao mosto, ela é submetida a uma pressão osmótica, e essa exposição desencadeia uma resposta da célula contra estresse. Em muitos processos fermentativos o estresse osmótico tem início no começo da fermentação, diminuindo após a redução gradual dos açúcares no meio.

Pressões osmóticas muito elevadas podem modificar o metabolismo da levedura ou diminuir a viabilidade da mesma (HEGGART et al., 1999).

Falta de Nutrientes

Uma deficiência de nutrientes fará com que as leveduras ataquem as proteínas, liberando H₂S (aroma de ovos podres). Também é necessária a presença de esteróis e ácidos graxos insaturados, obtendo-os inicialmente a partir do mosto e posteriormente a partir das células-tronco. Esteróis e ácidos graxos insaturados de cadeia longa são fundamentalmente necessários para que suas membranas celulares funcionem (HOUGH, 1990).

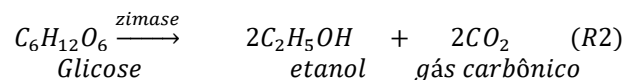
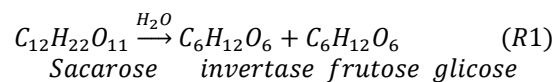
Temperatura

A variável temperatura está diretamente relacionada a velocidade da reação, nisso quanto maior a temperatura, maior será a velocidade da fermentação, logo, conseqüentemente maior será a probabilidade de contaminação por bactérias, maior a vulnerabilidade das leveduras perante a toxidez do álcool.

A Fermentação

A reação ocorre por ação das leveduras é a fermentação alcoólica. Os produtos obtidos são o etanol e o dióxido de carbono em proporção equimolar. Gay-Lussac foi o primeiro a comprovar esta reação, onde 100g de glicose rendem 51,1 g de etanol e 48,9 g de dióxido de carbono. O rendimento teórico de 51,1% em massa é conhecido como coeficiente de GayLussac e é dado básico para cálculo de eficiência de conversão, onde um mol de Glicose (180g/mol) é responsável por gerar 2 mols de Etanol (92g/mol) e 2 mols de Dióxido de Carbono (88g/mol) (JACKMAN, 1991).

Reação



O mel

O mel é uma solução concentrada de dois açúcares redutores: frutose e glicose com uma proporção de 69,5%, sendo em média 38,5% frutose e 31% de glicose da sua composição, que apresentam a capacidade de reduzir íons de cobre em solução alcalina (SILVA et al., 2006).

O Brasil tem vasto potencial para produção de mel de abelha, assim como a sua flora, extensão territorial e a variação do clima. Todos esses fatores influenciam o produto em suas propriedades físico-químicas (Tabela 1). Com o crescimento do mercado, o Brasil vem se tornando um grande produtor de mel e dos demais produtos apícolas (ESCOBAR; XAVIER, 2013; GOIS et al., 2013).

Tabela 1 - Composição média do mel de abelha.

Valor calórico e composição centesimal		Minerais	Vitaminas	
Calorias (kcal/100g)	304	Cálcio (mg/100g)	Vitaminas	0,5
Umidade (g/100g)	17,10	Fósforo (mg/100g)	Vit. C (mg/100g)	0,038
Carboidratos totais (g/100g)	82,40	Sódio (mg/100g)	Riboflavina (mg/100g)	0,121
Frutose (g/100g)	38,50	Potássio (mg/100g)	Niacina (mg/100g)	0,068
Glicose (g/100g)	31,00	Ferro (mg/100g)	Ac. Pantotênico (mg/100g)	0,024
Maltose (g/100g)	7,20	Zinco (mg/100g)	Vit. B-6 (mg/100g)	2
Sacarose (g/100g)	1,50	Magnésio (mg/100g)	Folato total (mg/100g)	0,001
Outros carboidratos g (100g)	4,00	Selênio (mcg/100g)		
Fibras (g/100g)	0,20	Cobre (mg/100g)		
Proteína total (g/100g)	0,30	Manganês (mg/100g)		

Fonte: (SILVA et al., 2006).

Água

A água exerce papel fundamental na fabricação, pois suas propriedades podem ocasionar alterações no resultado final. Além de influenciar o tempo de maturação, na conservação, doçura e no sabor, também servirá como um referencial na qualidade do mel. Ao se tratar de parâmetros não controlados pela ação humana, as propriedades físico-químicas do mel estão ligadas pela variação de temperatura, conseqüentemente sua densidade e viscosidade pode representar entre 16,4 e 20% do mel (SILVA et al., 2006). A água na produção de bebidas fermentadas deve ser livre de impurezas, filtrada, sem cloro, sabor e cheiro, inócua, livre de contaminações, para servir de nutriente para as leveduras fermentativas (REBELLO, 2009).

Fermento

Além da água, a fermentação do hidromel tem seu grau de relevância, pois está diretamente relacionada a temperatura e resultado final do produto. Temperaturas elevadas incapacitam o agente da levedura e trazem em torno de vinte compostos indesejáveis, enquanto que as temperaturas mais baixas tendem a reduzir a fermentação, implicando consideravelmente um aumento no número de dias e na queda de crescimento biológico. As leveduras que serão utilizadas devem conter características possíveis a serem previamente calculadas como tolerância osmótica e baixas restrições nutricionais, pois essas podem trazer notas indesejáveis ao paladar (SILVA et al., 2006).

Dada a necessidade de garantir uniformidade na qualidade do produto é fato de que há um grande número de variáveis envolvidas em uma fermentação espontânea, os produtores de vinho tornaram sua prática usual o uso de leveduras secas ativas (LSA) (TORIJA et al, 2002). A inoculação com LSA favorece um início mais rápido da fermentação (geralmente a fase de latência é reduzida) e um consumo total dos açúcares fermentáveis, reduzindo possíveis problemas de fermentação; também permite maior controle microbiológico. Foi demonstrado que com esta prática produz um produto de qualidade mais uniforme em todo o de todo o processo de obtenção do vinho (RIBÉREAU, 1985; VIVAS et al., 2003).

A segurança fermentativa é um dos objetivos essenciais de um enólogo. No entanto, às vezes é difícil obter em certas leveduras por conta das variedades de processos. Sob todas as condições, o **Lalvin EC 1118** é considerado um fermento abrangente, pois sua neutralidade aromática associada às suas qualidades fermentativas torna-o um dos mais indicados para utilização em hidroméis ou outras bebidas fermentadas (ALBAN, 2009).

Neste trabalho foi escolhido o fermento Lalvin EC 1118 (*Saccharomyces cerevisiae bayanus*) devido às propriedades microbiológicas e enológicas que ele contém que são: presença de proteína *killer*, a qual permite inibir a ação de leveduras de contaminação; tolerância ao álcool elevada, até 18 % álcool; rápida cinética fermentativa em um range amplo de pH; ampla gama de temperatura de fermentação, incluindo baixas temperaturas (entre 10 a 30 °C); baixa necessidade de nitrogênio assimilável; baixa necessidade de oxigênio especialmente em temperatura baixa; baixa produção de acidez volátil; produção média de SO₂; baixa produção de H₂S; e baixa produção de espuma. A representação gráfica do comportamento do fermento e sua cinética em comparação com outros tipos de levedura estão apresentadas na Figura 1.

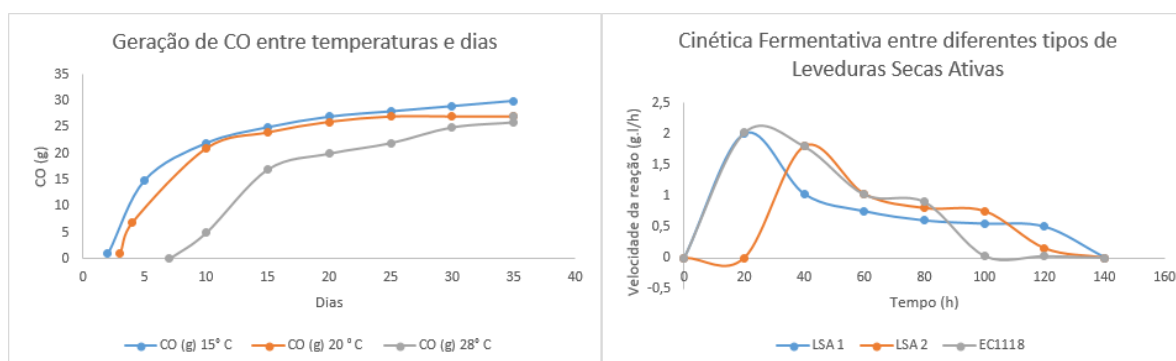


Figura 1 – Representação gráfica do comportamento do fermento utilizado em relação a temperatura e entre outros tipos de Levedura (Fonte: ALBAN, 2009).

Efeitos da Temperatura nos padrões analíticos

Torija e colaboradores (2002) desenvolveram análises químicas que foram realizadas em vinhos sob diferentes temperaturas (Tabela 2), todos apresentaram açúcares residuais abaixo de 2g l⁻¹. Onde o rendimento do etanol diminuiu à medida que as temperaturas aumentaram. Ácido acético, em particular, o glicerol aumentou conforme a temperatura aumentou. O acetaldeído teve concentração máxima quando a fermentação foi realizada a 20 °C, e concentração mínima a 35 °C. A soma de todos os produtos secundários (glicerol, ácidos acético e succínico e acetaldeído) aumentaram conforme a fermentação e as temperaturas aumentaram. Na verdade, esses resultados indicam duas mudanças no rendimento dos produtos de fermentação. Embora as diferenças entre o rendimento em 15 e 20 °C e o rendimento de 25 e 30 °C pode ser considerado sem importância (3g l⁻¹), deve-se considerar também a perda de CO₂. Por outro lado, as mudanças entre 30 e 35 °C são drásticas.

Tabela 2 – Análise Química de produto final pós fermentação.

Concentração (g l ⁻¹)	15 °C	20°C	25°C	30°C	35°C
Etanol	93,60±0,56 ^a	93,04 ±0,88	90,00±0,56	89,60 ± 0,00	79,52 ± 1,84
Glicerol	6,05 ±0,11	6,59 ±0,07	6,91 ±0,11	7,18 ± 0,02	7,38 ± 0,08
Acetaldeído	0,05 ±0,00	0,09 ±0,01	0,04 ±0,00	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Ácido Succínico	0,74 ±0,06	0,89 ±0,04	0,77 ±0,06	0,92 ± 0,08	0,70 ± 0,03
Ácido Acético	0,08 ±0,01	0,13 ±0,01	0,14 ±0,00	0,13 ± 0,01	0,22 ± 0,04
Soma de produtos	100,52	100,74	97,86	97,87	87,84
CO ₂	89,53	88,99	86,08	85,70	76,06
Produtos + CO ₂	190,05	189,73	183,94	183,57	163,90
Rendimento de Etanol	47,52	47,23	45,68	45,48	40,36

a Desvio Padrão. b Etanol Produzido (g l⁻¹) x 100 de açúcar inicial (g l⁻¹). Fonte: (TORIJA et al.2002).

Viabilidade Fermentativa

A viabilidade do fermento diminui à medida que aumenta a temperatura, devido ao maior acúmulo de etanol intracelular em temperaturas mais altas, o que seria toxicidade celular (NAGODAWITHANA et al., 1974) e alteraria a estrutura da membrana, diminuindo sua funcionalidade (LUCERO et al., 2000).

No entanto, em baixas temperaturas não houve declínio, então a fase estacionária durará até o final da fermentação.

O efeito de altas temperaturas é o fim prematuro da fermentação, o que significa que a fermentação está incompleta e a concentração de etanol é baixa. Sendo assim, a temperatura afeta não apenas a cinética de fermentação (taxa e duração da fermentação), mas também o metabolismo da levedura, que determina a composição química de bebidas fermentadas. Como esperado, a concentração final de álcool diminui com o aumento da temperatura, o que tem sido relacionado a uma queda no rendimento de etanol e um uso reduzido de substrato (TORIJA et al., 2002).

Resposta ao Estresse

O crescimento e funcionamento necessitam de um ambiente intracelular adequado. Onde quaisquer mudanças podem resultar em uma cadeia de variações onde pode reduzir a atividade enzimática e interrupção do fluxo metabólico onde a célula em condições de vulnerabilidade. Porém, *Sacchromyces cerevisiae* possui capacidade de se manter em homeostase interna diante de um ambiente instável (MELO, 2006).

O aumento da temperatura ocasiona o estresse metabólico fator que pode ser explicado por um efeito causado pelo choque térmico. Inicialmente as taxas metabólicas aumentam em decorrência da elevação de temperatura de todo o sistema, e subsequente, a resposta metabólica ao estresse. Esse aumento pode ser caracterizado como ativação do sistema de resposta ao estresse sendo elas: adaptação, inativação ou morte celular (MELO, 2006).

Estresse Metabólico

Sacchromyces cerevisiae possui a capacidade de resposta em estresse metabólico. Onde possui preferência como via metabólica a glicose como fonte de carbono e energia. Quando a glicose é limitada, o qual exige a presença de oxigênio. O metabolismo respiratório apresenta um maior rendimento em ATP (MELO, 2006). Em elevadas temperaturas desencadeia uma redistribuição do fluxo metabólico onde provoca um aumento instantâneo do metabolismo que em seguida diminui, alcançando um novo estado estacionário (MENSONIDES et al., 2002).

Estresse Osmótico

O estresse osmótico ocorre quando a levedura em contato com o mosto (líquido açucarado a ser fermentado) desencadeia uma resposta da célula contra estresse. No início da fermentação, o estresse osmótico é observado quando há redução gradual dos açucares do meio. Quando submetidos a altas temperaturas geram uma pressão osmótica mais expressiva podem modificar o metabolismo da levedura ou diminuir a viabilidade da mesma (HEGGART et al., 1999).

Manutenção Metabólica

As toxinas contidas na proteína *killer* são ativas contra uma variedade de diferentes leveduras, frequentemente fora do gênero e espécie das cepas produtoras. No entanto, interações entre a proteína e fungos patogênicos também foram descritas, indicando que tais toxinas de leveduras que contem este tipo de proteína em sua estrutura podem ter potencial agentes de biocontrole antimicótico para patógenos fúngicos de plantas e para o tratamento de infecções fúngicas em humanos e animais (BROWN, ROEMER, BUSSEY, 1999).

A Figura 2 mostra o efeito da temperatura na estabilidade da toxina *killer* de *S. cerevisiae*. A toxina manteve-se estável após 4 h de incubação a 8°C e 25°C a pH 4,1. A 30°C, a toxina reteve a atividade *killer* após 1 h de incubação; e perdeu 50% desta atividade após 2 h e 30 min. de incubação. A toxina *killer* foi completamente inativada por aquecimento a 40°C por 1 h em pH 4,1, apresentando instabilidade como outras toxinas *killer* de *Saccharomyces cerevisiae*, a temperaturas acima de 38°C, após a primeira hora de incubação (BROWN, ROEMER, BUSSEY, 1999).

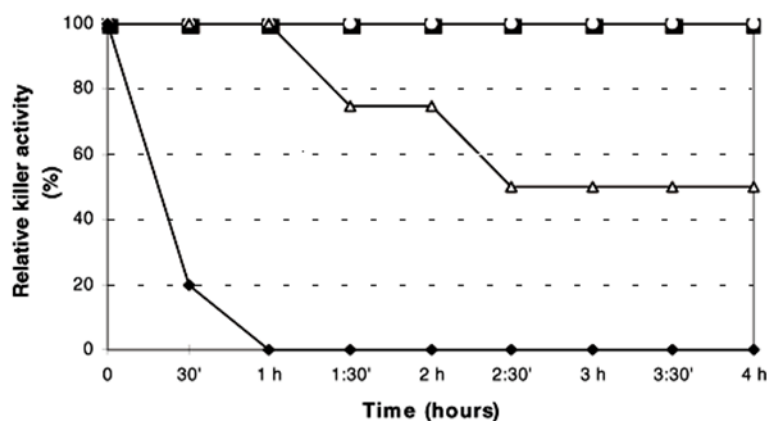


Figura 2 - Atividade da proteína *killer* em relação ao tempo de atividade presente na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: (BROWN, ROEMER, BUSSEY, 1999).

Reação

O etanol é um composto químico constituído de carbono, hidrogênio e oxigênio. Sua característica principal é a presença de uma hidroxila ligada a um radical a um hidrocarboneto. O etanol é um líquido incolor, límpido, de cheiro agradável e fortemente penetrante, seu sabor é caustico e ardente (DAMASCENO,2010).

Quando a *Saccharomyces* entra em contato com o mosto, a sacarose, glicose e a frutose constituem os primeiros substratos a serem utilizados pelas células onde são degradadas até sua transformação em ácido pirúvico, por uma sequência ordenada de reações catalisadas por enzimas específicas. Em anaerobiose há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico (TOSETTO, 2008).

Como os açúcares não atravessam a membrana celular livremente, a sua passagem requer a ação de proteínas transportadoras denominadas permeases (ZASTROW E STAMBUK, 2000). Os monossacarídeos são transportados por difusão facilitada conhecido como hexoses (HXT1-HXT7) sendo que alguns possuem alta e outros baixa afinidade pela glicose. Todas estas permeases diferenciam-se pelas afinidades com a glicose e frutose, sendo a maioria com a glicose. Por este motivo a glicose do meio é captada mais rapidamente do que a frutose (ZASTROW e STAMBUK, 2000).

A sacarose, dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose unidas através de uma ligação α -1 β -2, é hidrolizada extracelularmente por invertases específicas, sendo que os monossacarídeos formados são captados pelos transportadores de hexoses descritos acima (CARLSON, 1987).

Uma vez transportadas para o interior das células, a glicose e a frutose são degradadas pela via glicolítica transformando as moléculas simples (monossacarídeos), por uma enzima denominada invertase. Esses monossacarídeos são em seguida submetidos à ação de outra enzima, denominada zimase, até piruvato ser totalmente convertido a CO_2 e H_2O pelo ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa, ou então, ser degradado até etanol e CO_2 pelo processo denominado de fermentação alcoólica (GANCEDO e SERRANO, 1989).

Material e Método

Densidade do mel

Com uma balança analítica e dois balões volumétricos de 100 ml, foi realizada a medição de densidade do mel em um ambiente de 20 °C. Foi inserido o balão na balança e realizada a tara. Após, foi retirado o balão e com o auxílio de uma pipeta descartável foi completado o volume até o menisco. Novamente sua massa foi aferida e, dividindo a massa pelo volume de 100 ml, determinou-se a densidade. O procedimento foi realizado em duplicata.

Com os resultados foi realizada a média e encontrada a densidade do mel. Como a proporção de preparo é de 37% em volume, foi realizada a multiplicação da proporção de mel pela densidade obtida para encontrar a massa contida na solução, com a razão de proporção de mel e da água foi encontrado a densidade final da solução.

Montagem do Biorreator e estufa

Como tanque do reator batelada, foram utilizados balões volumétricos de 1L, uma rolha de polipropileno como selo de vedação e uma válvula *Air Lock* Tipo “S” a fim de evitar a entrada de oxigênio e liberar Dióxido de Carbono proveniente da reação.

Para estufa foram utilizadas madeira compensada, uma manta de isolamento térmico de alumínio e uma lâmpada incandescente de 100 W para geração de energia térmica.

A fim de criar condições ideais de temperatura contínua, ou seja, um ambiente de temperatura controlada. Pois, exercem função de barreira que impedem trocas térmicas entre o meio externo e interno, sendo assim, garantindo uniformidade térmica.

Sanitização do Biorreator e Utensílios

Para a sanitização dos biorreatores e utensílios, foi utilizada uma solução sanitizante a base de PAC 200, medido na colher padrão fornecida no sanitizante, 20 g de PAC 200 diluídos em 10 litros de água e realizada homogeneização, conforme recomendação do fabricante, aguardado 1 hora e colocado a solução nos biorreatores e utensílios por 10 minutos.

Preparação do Mosto

Para a produção de hidromel, preparou-se o mosto a partir da diluição de mel com água potável em uma proporção de 37%. A levedura mais utilizada para produção da bebida pertence à marca Lalvin tipo EC 1118, pois possui capacidade de resistir a altos níveis de teor alcoólico (>16%) (FERNANDES et al., 2009).

O mel silvestre foi adquirido na cidade de Amparo - SP de um apicultor local situado em área rural, com uma colher de sopa, foram inseridos 370 ml de mel aproximadamente 426 g na proveta e transferido para o recipiente de homogeneização. Em uma segunda proveta foram inseridos 630 ml de água aproximadamente 630 g e transferido para o recipiente de homogeneização. Parte desse volume de água foi transferido na proveta com mel para conseguir remover todo o mel que ficou nas paredes da proveta. Foi então realizada a total homogeneização do mel em água.

Aferição da densidade da mistura

A densidade da mistura mel e água foi determinada pelo densímetro da marca H&G.

Preparo da Levedura

Conforme recomendado pelo fornecedor da EC1118, a levedura foi aquecida (*starting*) com a adição da solução em temperatura controlada a 35°C por um termômetro digital (BILBOS – BL101) em um recipiente de inox. A homogeneização foi feita até total diluição das macro partículas de fermento serem incorporadas.

Acondicionamento das Amostras

Com o auxílio de um funil, foi transferida a solução para os biorreatores e instalado as rolhas de polipropileno ideal para a vedação entre o bocal do balão e a conexão da válvula *Air Lock*, sequencialmente, foi completada cada uma das válvulas com um pequeno volume de água para que não houvesse a entrada de oxigênio e liberação de CO₂. Nesta etapa também foi utilizada uma proveta para completar as válvulas *Air Lock* com água

Cálculo do rendimento da reação de fermentação

Para o cálculo do rendimento da reação de fermentação, a temperatura da amostra deve estar em 20°C. Desta forma, as amostras foram retiradas do refrigerador e da estufa e foi aguardada a estabilização das temperaturas em 20°C. A amostra a temperatura ambiente já estava com essa temperatura. O hidromel filtrado com o auxílio de um filtro de café de papel da marca Melitta® de graduação 103 para separação do fermento. O hidromel foi transferido para uma proveta da marca Deltex® e inserido o densímetro H&G, anotada a densidade e aplicada a fórmula de %ABV (*Alcohol by volume*), apresentada na Equação 1.

$$\%ABV = 131,25 \times (OG - FG) \quad (1)$$

Onde o OG é o valor da densidade antes da fermentação e FG o valor da densidade após a fermentação, esse valor é multiplicado pelo fator 131,25 que resulta no valor do teor alcoólico do hidromel. Foi realizado esse mesmo procedimento para todas as amostras.

Cálculo de 100% da reação da fermentação

Silva e colaboradores (2006) afirmaram que o mel é uma solução concentrada de dois açúcares redutores: frutose e glicose com uma proporção de 69,5%. Partindo deste princípio, através do cálculo de densidade foi possível estipular sua massa, a partir da pesagem da solução (água e mel) em uma proveta de 100 mL. Seguindo padrões empíricos em 37% de mel na solução (Fernandes et al, 2009). Sendo assim, para estabelecer a quantidade teórica do açúcar utilizou a proporção da concentração dos açúcares redutores pela razão da

concentração teórica do mel. Foi calculada a quantidade de mol presente no açúcar da amostra. E em seguiu a quantidade de mols contidos de glicose na amostra baseado em sua massa molar de 180g/mol (JACKMAN, 1991).

Considerando a reação balanceada R2, a proporção molar é de 1:2:2 (1 C₆H₁₂O₆ Glicose, 2 C₂H₅OH Etanol e 2 CO₂ Dióxido de Carbono) e foram realizados cálculos estequiométricos para a determinação da quantidade de mols e a massa de etanol e CO₂. Com a densidade do etanol de 0,79 g/ml (FISPQ), pode-se determinar o volume de etanol gerado.

Resultados e Discussão

No processo de fermentação a temperatura variou durante o período de trinta e cinco dias, onde é possível visualizar seu comportamento em relação aos ambientes em que as amostras foram alocadas, conforme gráfico da Figura 3.

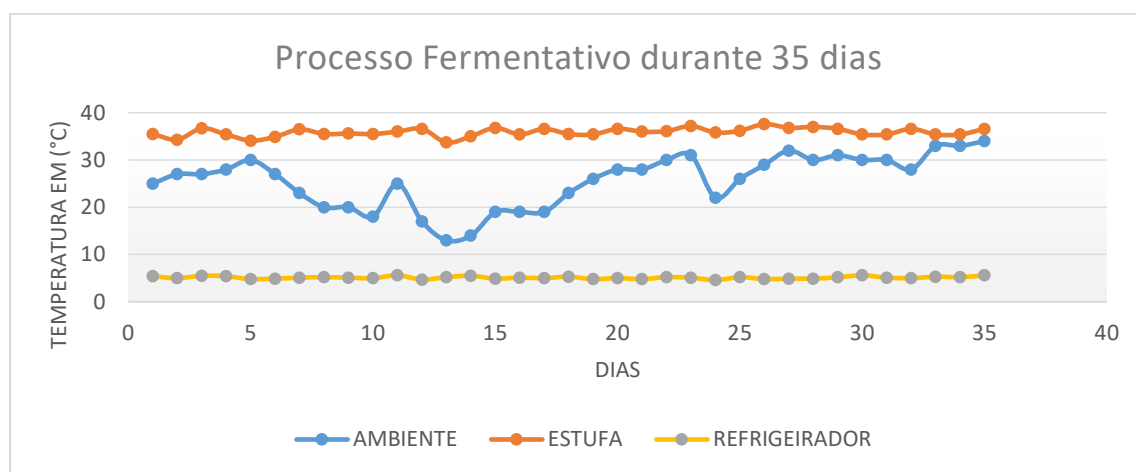


Figura 3 – Temperatura ao longo de trinta e cinco dias durante a fermentação entre os dias 09/08/2020 até 13/09/2020. Fonte: Próprio Autor

Para a média da temperatura ambiente, foram consideradas as temperaturas máximas e mínimas dos dias no período, essas informações foram coletas no site de previsão do tempo Climatempo (<https://www.climatempo.com.br>). As médias das temperaturas com seus respectivos desvios padrões estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Média e Desvio Padrão das Temperaturas ao final dos trinta e cinco dias de fermentação.

	Ambiente	Estufa	Refrigerador
Média (° C)	27	36	5,2
Desvio Padrão Temperatura	5,69	0,45	0,26

Fonte: Próprio Autor

Para os cálculos médios das temperaturas nos ambientes foram realizadas as somas das temperaturas e dividido pelos números de dias coletados, já os cálculos de desvio padrão, foi aplicado a fórmula com o auxílio de uma planilha de Excel.

Durante o processo de fermentação no período de 09/08/2020 a 13/09/2020 observou-se que as amostras expostas ao ambiente sofreram a maior variação, pois houve no período uma variabilidade no clima, com amplitude diária de 13°C a 34°C, fato indicado pelo de desvio padrão. No refrigerador houve uma variabilidade muito pequena, valor máximo de 0,9°C, assim seu desvio padrão ficou com o menor índice das três amostras. Na estufa, mesmo também sendo um ambiente controlado, a variação foi maior que no refrigerador, com valor máximo de 3,9°C.

Análises Qualitativas

Após a fermentação, as amostras foram filtradas como mostra Figura 5, e foi observado que no papel filtro continham partículas de fermento não dissolvidos para posteriormente evitar quaisquer resultados equivocados de densidade que implicam diretamente no percentual alcoólico obtido.

Observou-se que as amostras fermentadas em estufa e no refrigerador estavam com sua coloração semelhante ao mel (Figura 4), o que pode indicar menor teor alcoólico, uma vez que o mel não foi totalmente consumido. Porém, as amostras submetidas a altas temperaturas estavam com odor acético. Alban (2009) evidencia que o forte odor pode ser proveniente da geração de H₂S (ácido sulfídrico), seu odor é semelhante a ovos podres. Devido ao fato de que as leveduras submetidas ao processo fermentativo precisam de açúcares para seu catabolismo, isto é, para obter a energia necessária para seus processos vitais, mas eles também precisam de outros substratos para seu anabolismo, como nitrogênio, fósforo, carbono, enxofre, potássio, magnésio, cálcio e vitaminas, especialmente tiamina (vitamina B1). Portanto, é de vital importância que o meio tenha uma base nutricional adequada para ser capaz de realizar fermentação alcoólica. A deficiência de nutrientes causará um estresse metabólico onde ocorrerá uma degradação inadequada dos açúcares presentes, liberando ácido sulfídrico. As amostras submetidas à baixas temperaturas, apresentaram aroma semelhante ao mel.

Somente as amostras fermentadas à temperatura ambiente tiveram sua coloração clarificada, e podem ter tido o melhor rendimento de conversão alcoólica, pois espera-se ter havido a quebra dos açúcares do mel e transformação em etanol. O aroma apresentava aspectos indiferentes ao mel e remetentes ao álcool.

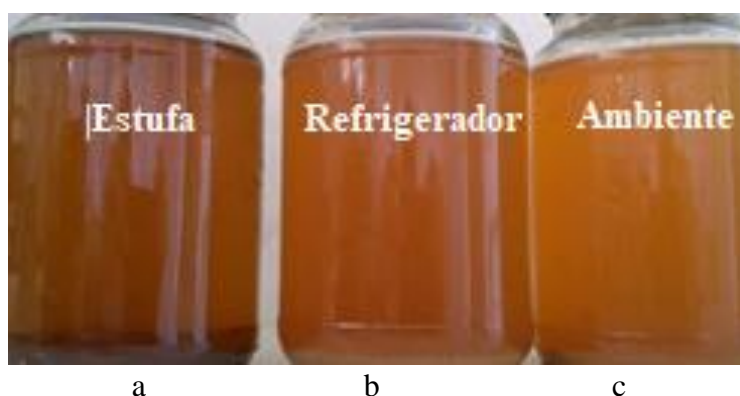


Figura 4 – Comparativo das características visuais do fermento após a fermentação.

Análises Quantitativas

Cálculos de densidade do mel

A Tabela 4 apresenta os valores da duplicata da medida da massa do mel para 100 ml e a massa média com seu desvio padrão.

Tabela 4 – Dados obtidos para obtenção da densidade das amostras e média.

Balão Volumétrico (100 ml)	Massa mel (g)
Amostra 1	140,9195
Amostra 2	141,2688
Média	141,09415
Desvio Padrão	0,2470

Fonte: Próprio autor

A massa média do mel para 100 ml foi de 141,09415 g, o que proporciona uma densidade de 1,4109415 g/ml.

Cálculos de densidade da solução

A densidade inicial da solução é dada pela média ponderada entre a média da densidade das amostras de mel e a porcentagem do volume, e a densidade de água e seu volume. O valor calculado foi de 1,152 g/ml.

$$d_{\text{solução}} = 1,4109415 \cdot 0,37 + 1,0,63 = 1,152 \text{ g/ml}$$

Todos os cálculos realizados adiante para a determinação de teor alcoólico são provenientes de equação. Desta forma, para validar esse resultado, determinou-se a densidade da solução também por densímetro, o qual apresentou o mesmo valor de 1,152 g/ml.

Cálculo teórico de fermentação com 100% de rendimento

Após a fermentação, a densidade da solução final (FG) foi determinada pelo densímetro, e os valores de cada amostra estão apresentados na Tabela 5.

Com o valor da densidade inicial de 1,152 g/ml na solução de água e mel (OG) e uma concentração de 37% de mel foi obtida uma massa em mel de 42,624 g de mel na solução, como porcentagem de açúcar do mel é de 69,5%, foi calculado a quantidade de 29,6237g açúcar presente na amostra utilizando método de proporcionalidade (SILVA et al., 2006) e (FERNANDES et al., 2009).

Calculada a quantidade de mols contidos em 29,6237g de glicose e baseado na massa molar de 180g/mol (JACKMAN, 1991) obteve-se 0,1646 mols de glicose. Sabendo que a proporção molar é de 1:2:2, foi determinado que são produzidos 0,3292 mols de etanol e CO₂.

Com a massa molar dos compostos etanol (46 g/mol) e CO₂ (44 g/mol) e o valor de 0,3292 mols, foi calculada massa de etanol e CO₂ da reação, sendo 15,141 g de etanol e 14,483 g de CO₂.

Com a densidade do etanol retirada da FISPQ em 0,79 g/ml, calculou-se o volume de etanol gerado em 19,16 ml.

Pela Equação 1, foi determinado o teor alcoólico teórico de cada amostra.

Tabela 5 – Dados obtidos entre os ambientes e suas amostras para obtenção da quantidade de Álcool por volume.

	Ambiente			Estufa			Refrigerador		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
OG	1,152	1,152	1,152	1,152	1,152	1,152	1,152	1,152	1,152
FG	1,068	1,072	1,074	1,041	1,04	1,04	1,15	1,151	1,15
ABV	11%	10,50%	10,24	1,44%	1,58%	1,58%	0,26%	0,13%	0,26%

Fonte: Próprio autor

A média do teor alcoólico de cada ambiente de fermentação com seu desvio padrão está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Cálculo médio de Desvio Padrão e Rendimento da reação em relação ao 19,17% do total possível teórico.

	Ambiente	Estufa	Refrigerador
Média	10,58%	1,53%	0,22%
Desvio Padrão %ABV	0,32%	0,07%	0,06%
Rendimento	55%	7,98%	1,15%

Fonte: Próprio autor

Conforme observado na análise qualitativa, as amostras que ficaram expostas às condições e variações de temperatura do meio ambiente apresentaram o melhor rendimento da reação de fermentação ($10,58 \pm 0,32\%$). Mesmo com variações de quase $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (mínima 14 e máxima 30) foram obtidos resultados acima de 10% de volume de etanol, devido à faixa de temperatura permanecer dentro dos padrões que a literatura estipula como ideais para o processo fermentativo a base de EC1118, que é o rendimento da reação obtido foi de 55% com desvio padrão pequeno, porém, o maior em relação as outras condições de temperatura que foram realizados os testes de fermentação. Na literatura o valor esperado é de 21% a 70% que se refere 4% a 14% em álcool devido as normas vigentes. Neste caso, constatou que este meio foi o mais favorável em questões de rendimento da reação.

As amostras que ficaram expostas a condições de temperaturas elevadas foram aquelas que tiveram o segundo melhor rendimento da reação de fermentação, porém, com valores muito abaixo do apresentado pela literatura e normas de comercialização. Mesmo com baixas variações de temperatura obtiveram-se resultados próximos de 1,50% de volume de etanol, devido à faixa de temperatura permanecer acima do que a literatura estipula como ideais para o processo fermentativo a base de EC1118 alcoólica de 4 a 14% de volume de etanol, acarretando na aceleração da reação e na morte prematura do fermento. O rendimento da reação obtido foi de aproximadamente 8% com desvio padrão pequeno, mostrando uma uniformidade de temperatura dentro da estufa.

Nas amostras que ficaram expostas às condições de baixas temperaturas, a pequena fermentação ocorreu devido ao processo de *starting* do fermento, o qual foi cessado quando as trocas de calor entre as paredes do balão volumétrico e o ambiente refrigerado passaram ser a mesmas próximo a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mesmo com baixas variações de temperatura obtiveram-se resultados próximos de 1,15% de volume de etanol, devido à faixa de temperatura permanecer muito abaixo do que a literatura estipula como ideais para o processo fermentativo a base de EC1118, acarretando na estagnação do processo.

Em relação ao desempenho fermentativo do EC1118 como mostra na Figura 1, o experimento comprovou que há um crescimento exponencial na cinética fermentativa em um intervalo de tempo de 20 horas onde a levedura trabalha em condições ótimas de temperatura. Esse fator é correlacionado ao *starting* do fermento, onde inicialmente as três amostras possuíam a mesma cinética, porém, as amostras em estufa acarretaram em um estresse metabólico onde a alta temperatura acarretou em um pico de velocidade, e após isso, uma queda. Na amostra refrigerada, a velocidade da reação passa a diminuir conforme a diminuição da temperatura.

Conclusões

Após os estudos, foi concluído que os existe uma faixa ideal de temperatura para a fabricação de hidromel, com base no fermento EC1118, está entre $15\text{ e }30^{\circ}\text{C}$, apresentado na literatura (TORIJA et al., 2002) e comprovado experimentalmente. As amostras condicionadas a temperatura ambiente ficaram expostas dentro da faixa considerada ideal, com isso apresentou o melhor resultado de formação de etanol com relação aos outros

ambientes expostos. Na análise sensorial, o aroma do álcool se sobrepõe ao do mel o que evidência tais fatos.

Em temperaturas muito altas, há um início de fermentação, porém a morte das leveduras ocorre de maneira acelerada. Em contrapartida, nos casos de baixa temperatura pode-se considerar que praticamente não ocorrem as reações de fermentação. Atribui-se a uma pequena produção de etanol na amostra refrigerada, pelo processo de *starting* do fermento, isso se deve ao fato da levedura ter iniciado o processo do consumo de glicose, porém, foi pausado devido a temperatura do refrigerador ser transferida para solução de água em mel por convecção.

Na amostra submetida a altas temperaturas, o processo de consumo de glicose foi acelerado porém houve morte precoce, e, com isso foi obtido um baixo rendimento na formação de etanol e desenvolvimento de bactérias acarretando em odores indesejados acéticos e coloração escura.

Com os resultados obtidos, conclui-se que não se torna viável o investimento em equipamentos para manter um sistema aquecido para a fermentação nos períodos de inverno e sim desenvolver sistemas de bloqueio de baixas temperaturas externas ao ambiente de fermentação, obtendo variações, temperaturas mínimas e máximas admissíveis.

Referência Bibliográfica

ALBAN, M.; 2009. **Efecto de la utilización de enzimas pectolíticas (lallzyme c-max) en un mosto elaborado com levadura vinica (Lalvin Ec 1118) y de panificación para la producción de vino de manzana variedad emilia** – trabalho de graduação disponível em: </ <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/2105/1/AL441%20Ref.%203287.pdf> > acesso: 29 de maio de 2020.

BRASIL. **Instrução Normativa No 34, De 29 De Novembro De 2012**. Diário Oficial da União, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2012.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 64, de 23 de abril de 2008. Ministério da agricultura, Pecuária e abastecimento. Anexo III, regulamento técnico para a fixação dos padrões de Identidade e qualidade para hidromel**. Diário oficial da união, Brasília, DF, 24 abr. 2008.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação descontínua**. Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher, v. 2, p. 193-204, 2001.

CLIMA TEMPO. **Temperatura e clima nas regiões de São Paulo**. Clima Tempo, Atibaia, 20 de jun. de 2018. Disponível em: < <https://www.climatempo.com.br>>. Acesso em: 13 de set. de 2020.

DANTAS, T. **Avaliação cinética da fermentação alcoólica de mel industrial como substrato na produção de hidromel**. Universidade Federal do espírito santo. Disponível em <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-24032015-165257/publico/bit14010_c.pdf>. Acessado em 15 mar.2020.

ESCOBAR, A. L. S.; XAVIER, F. B. **Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas**. Uningá, Maringá, n. 37, p.159-172, set. 2013

FERNANDES, D.; LOCATELLI, G. O.; SCARTAZZINI, I.S. **Avaliação de diferentes estirpes de levedura saccharomyces cerevisiae na produção de hidromel, utilizando méis residuais do processo de extração**. evidência, joaçaba v. 9, p. 29-42, janeiro/dezembro 2009.

GONZALES, T.; **Estudo Fenológico do reator batelada alimentada utilizando dois processos fermentativos distintos.** tese (doutorado em engenharia de alimentos) universidade estadual de campinas. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/reposip/255470/1/gonzales_tatianearaujo_m.pdf> Acessado em 15 mar.2020

HEGGART, M. M. et al. **Fators affecting yeast viability and vitality characteristics: a review.** mbaatq, v. 33, p. 383–406, 1999.

JACKMAN, E.A.; BU'LOCK, J.; KRISTIENSEN, B. **alcohol industrial. inbiotecnología básica. zaragoza:acríbia,** 1991. 577p.

MELO, H.; 2006. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial.**Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos. Disponível em <https://attena.ufpe.br/bitstream/123456789/650/1/arquivo4595_1.pdf> Acesso em 01 de Outubro de 2020.

PASCAL RIBEREAU-GAYON E COLABORADORES. **Tratado de enologia.** Edição mundi-prensa. Editorial hemisfério sur. Buenos aires argentina 2003.

FISPQ. **Densidade do etanol.** Disponível em <<http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Etanol.pdf>> Acesso em 05 de Outubro de 2020.

PEREIRA, A. P.; DIAS, T.; ANDRADE, J.; RAMALHOSA, E.; ESTEVINHO, L. M. **mead production: selection and characterization assays of saccharomyces cerevisiae strains.** food and chemical toxicology, v.47, p.2057-2063. aug 2009.

PEREIRA, A. P.; MENDES-FERREIRA, A.; OLIVEIRA, J.M.; ESTEVINHO, L. M.; MENDES-FAIA, A. **high. Cell-density fermentation of saccharomyces Cerevisiae for the optimization of mead production.** Food microbiology, v.33 p.114-123, Setembro 2013.

QUEIROZ, J. et al.; **Produção de hidromel de forma artesanal e avaliação dos parâmetros durante o processo fermentativo** - Revista Saúde e Ciência p.321-329, set/dez 2014.

REBELLO, F. F. P.; **Produção De Cerveja características fermentativas.** Revista Agrogeoe Ambiental, inconfindentes, n. 3, p.145-155, dez. 2009.

SILVA, A. et al.; **Composição e Propriedades Terapêuticas Do Mel De Abelha.** Alim. Nutr., araraquara v.17, n.1, p.113-120, jan./mar 2006.

SOUSA, G. S. **Estudo da fermentação alcoólica em um biorreator de leito fixo em sistema contínuo com células de saccharomyces cerevisiae imobilizadas em alginato cálcio revestido com quitosana.** dissertação (mestrado em engenharia química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

TORIJA, M. et al. **Ecología de Levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas.**Universidad de Rovira i Virgili. Tarragona, Espanha 2002. 260 – 264pp.